

## Preparation of nucleic acid derivatives

Patent Number: ☐ GB2207138

Publication date: 1989-01-25

Inventor(s): OHGI TADAAKI;; YANO JUNICHI

Applicant(s): NIPPON SHINYAKU CO LTD

Requested  
Patent: ☐ FR2617403

Application  
Number: GB19880015262 19880627

Priority Number  
(s): JP19870167434 19870703

IPC  
Classification: C12Q1/68; C07H21/02

EC  
Classification: C07H21/00C2

Equivalents: AT169988, AT397658B, AU1864488, ☐ CH676123, CN1024556B, CN1030424, ☐ DE3822406, DK369088,  
☐ ES2007252, FI883163, HU48272, ☐ IT1224504, ☐ NL8801664, NO882922, ☐ PT87903, ☐ SE8802480,  
ZA8804698

---

### Abstract

---

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 617 403**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **88 08938**

⑤1 Int Cl<sup>4</sup> : A 61 K 31/70; C 07 H 21/02, 21/04.

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②2 Date de dépôt : 1<sup>er</sup> juillet 1988.

③0 Priorité : JP, 3 juillet 1987, n° 62/167.434.

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 1 du 6 janvier 1989.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : NIPPON SHINYAKU CO., LTD. — JP.

⑦2 Inventeur(s) : Junichi Yano ; Tadaaki Ohgi.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Novapat-Cabinet Chereau.

⑤4 Procédé de préparation de dérivés des acides nucléiques et procédé de préparation d'une composition médicale les  
contenant.

⑤7 Procédé de préparation de polymères des acides nucléi-  
ques à double brins calibrés dans lequel des polymères d'acide  
nucléique à brin unique sont calibrés puis recuits. Par ce  
procédé, on peut obtenir des dérivés d'acide nucléique à  
double brin ayant le RNA comme corps apparenté, dont la  
distribution des tailles moléculaires est dans l'intervalle de  
valeur de la constante de sédimentation de 4S à 13S, ainsi  
que ceux dans lesquels les molécules pour la répartition maxi-  
male dans la distribution totale des tailles moléculaires des  
dérivés ont des nombres de bases dans l'intervalle de 50 à  
10 000. Le procédé est industriellement avantageux car la  
vitesse de réaction est grande et le rendement en produits est  
élevé. Les produits sont utilisables comme ingrédient actif  
comme composition antitumorale ou composition antivirale car  
ceux-ci ont de fortes activités physiologiques et sont peu  
toxiques.

FR 2 617 403 - A1

## 1.

La présente invention concerne un procédé de préparation de dérivés des acides nucléiques et un procédé de préparation d'une composition médicale contenant ces dérivés.

- 5 Les acides nucléiques sont composés de cycles purine et de cycles pyrimidine et de ribose ou de sucres analogues sous forme liée aux cycles, ces éléments constitutifs étant liés les uns aux autres par un pont phosphate pour former une structure en chaîne.
- 10 Parmi les acides nucléiques, le RNA (polymère de ribonucléotide) est un composé macromoléculaire à structure en chaîne ayant comme sucre le ribose dans lequel les parties sucre sont liées les unes aux autres par un pont phosphate par la liaison diester. Dans les acides
- 15 nucléiques à deux brins, les parties cycles purine ou cycles pyrimidine des bases constituant l'acide nucléique (par exemple l'inosine, l'adénosine, la cytidine,

## 2.

l'uridine, etc.) sont liées par une "liaison hydrogène complémentaire " pour donner une stéréostructure en double hélice. Comme on s'attend à ce que des acides nucléiques ayant une structure à deux brins aient des fonctions physiologiques utiles, de nombreuses études ont été effectuées jusqu'à présent sur ces acides nucléiques (Biochemical and Biophysical Research Communications, 58, 1974, etc.).

Parmi les acides nucléiques de cette espèce, un RNA synthétique à deux brins, dérivé de l'acide polyinosinique.acide polycytidylique est désigné ci-après sous le nom de dérivé "poly-I.poly-C" et l'acide polyinosinique qui est la partie constitutive de ce dérivé, est désignée sous le nom de "poly-I" et l'acide polycytidylique sous le nom de "poly C".

Récemment, on a trouvé que divers RNA naturels et synthétiques à deux brins avaient une capacité d'induction de l'interféron (Field et coll., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 58, 1004, 1967; Field et coll., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 58, 2102, 1967; Field et coll., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 61, 340, 1968; Tytell et coll., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 58, 1719, 1967; Field et coll., J. Gen. Physiol., 56, 905, 1970; De Clercq et coll., Methods in Enzymology, 78, 291, 1981).

Des exemples typiques de dérivés connus d'acides nucléiques synthétiques sont mentionnés ci-dessous.

Dérivés d'acides nucléiques synthétiques pour inducteur de l'interféron

(I) Complexes homopolymère.homopolymère (polymères d'acide nucléique à deux brins ayant le poly-I.poly-C comme structure apparentée.

(1) Dérivés modifiés par des bases :

Acide polyinosinique.poly(acide 5-bromocytidylique;

Acide polyinosinique.poly(acide 2-thiocytidylique);

## 3.

Acide poly(acide 7-déazainosinique).acide polycytidylique;

Acide poly(7-déazainosinique).poly(acide 5-bromocytidylique).

5 (2) Dérivés modifiés par des sucres :

Poly(acide 2'-azidoinosinique).acide polycytidylique.

(3) Dérivés modifiés par l'acide phosphorique :

10 Acide polyinosinique.poly(acide cytidine-5'-thiophosphorique).

(II) Copolymères intermodifiés :

Poly(acide adénylique-acide uridylique).

(III) Complexes homopolymère.copolymère :

15 Acide polyinosinique.poly(acide cytidylique, acide uridylique);

Acide polyinosinique.poly(acide cytidylique, acide 4-thiouridylique).

(IV) Complexes acide synthétique/polycation :

20 Acide polyinosinique.acide polycytidylique.poly-L-lysine

(désigné ci-après sous le nom de "poly-ICLC").

(V) Autres :

Acide polyinosinique.poly(acide l-vinylcytidylique).

25 Comme il a été indiqué ci-dessus, divers types de RNA à deux brins, en particulier des dérivés comprenant le poly-I.poly-C comme corps apparenté, ont été signalés ces dernières années. Il existe une théorie bien établie sur une série de dérivés des acides nucléiques, dont ceux-ci en ce qui concerne les relations entre la structure des dérivés et leurs fonctions (De Clercq et coll., Texas Reports on Biology and Medicine, 41, 77, 1982).

35 La demanderesse a trouvé sur la base de la technique antérieure mentionnée ci-dessus, que lorsque

## 4.

le poly-I.poly-C et divers dérivés de celui-ci ayant une partie poly-I.poly-C comme corps apparenté sont calibrés de telle sorte que la répartition de toutes les tailles moléculaires des dérivés puisse tomber dans l'intervalle de valeur de la constante de sédimentation de 4S à 13S (soit un nombre de bases des dérivés de 50 à 10 000), les dérivés ainsi calibrés peuvent avoir une toxicité notablement abaissée et peuvent conserver les activités physiologiques qui seront mentionnées ci-dessous. En conséquence, la demanderesse a déposé des demandes de brevet à l'Office japonais des brevets (demande de brevet japonais n° 62-167433 et une autre demande de brevet avec la priorité de cette demande n° 62-167433).

En même temps que l'étude ci-dessus, la demanderesse a encore étudié divers moyens pour obtenir avec un bon rendement les produits ci-dessus. En particulier, elle a effectué diverses études sur un moyen de calibrer des dérivés d'acide nucléique pour qu'ils aient une répartition des tailles moléculaires correspondant à 50 à 10 000 bases et un moyen pour former un polymère d'acide nucléique à deux brins à partir de deux types de polymères d'acide nucléique à un seul brin. En ce qui concerne le premier moyen, l'opération de limitation de la répartition des tailles moléculaires des dérivés d'acide nucléique dans un intervalle déterminé est désignée sous le nom de "calibrage". Comme le calibrage est accompagné d'une conversion en substances de faible masse moléculaire conformément au procédé de l'invention, le calibrage comprend un "raccourcissement des chaînes". En ce qui concerne le dernier moyen, celui-ci est désigné ci-après sous le nom de "recuit".

La paire de bases (désignées ci-après sous le nom de "pb") qui est généralement utilisée comme unité pour représenter la taille moléculaire des acides nucléiques peut être employée pour représenter la taille

## 5.

moléculaire des acides nucléiques par le nombre des bases constituant l'acide nucléique. (Par exemple, "10 pb" signifie un polymère à double brin ayant 10 bases). Dans le présent mémoire, il est également fait mention d'autres polymères d'acide nucléique que les polymères à deux brins en plus des polymères d'acide nucléique, et par conséquent, le terme "nombre de bases" est utilisé ici à la place de "pb" pour représenter la taille moléculaire des acides nucléiques. (par exemple, un polymère d'acide nucléique ayant un "nombre de bases de 10" signifie que le polymère a 10 bases).

Lorsque la taille moléculaire d'un acide nucléique doit être déterminée ou identifiée, on utilise en général une "valeur de constante de sédimentation" (valeur S). Cependant, la demanderesse a pu obtenir le nombre de bases des acides nucléiques mentionné ci-dessus au moyen d'une chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en utilisant une colonne de filtration sur gel ou une électrophorèse (décrite ci-dessous en détail) dans laquelle le DNA à deux brins (fragments de DNA de phage M13) ayant des tailles moléculaires connues est utilisé comme marqueur, et le nombre de bases de l'acide nucléique à déterminer est calculé à partir du nombre du témoin.

Jusqu'à présent, la valeur de la constante de sédimentation (valeur S) a été largement utilisée pour la représentation de la masse moléculaire des acides nucléiques macromoléculaires. Les acides nucléiques macromoléculaires qui existent dans le commerce sont représentés par leur valeur S. Cependant, en raison des progrès des techniques expérimentales de ces dernières années, un moyen pour déterminer de manière plus précise la masse moléculaire des substances macromoléculaires a été mise au point en utilisant l'électrophorèse sur gel, la chromatographie de filtration sur gel, la chromatographie d'échange d'ions etc. de telle sorte que la détermination

## 6.

de la longueur de chaîne des acides nucléiques macromoléculaires est devenue possible. Dans ces conditions, la relation entre la représentation par la valeur S et la représentation par la longueur de chaîne deviendrait problématique. En particulier, comme les molécules respectives d'acide nucléique ont leurs valeurs intrinsèques dans le cas de la représentation par la valeur S, la question de savoir si oui ou non la représentation par la valeur S et la représentation par la longueur de chaîne peuvent correspondre exactement l'une à l'autre comme moyen de représenter la masse moléculaire des acides nucléiques ne pose pas toujours de problème.

En conséquence, pour la présentation de la masse moléculaire des polymères d'acide nucléique de la présente invention, la représentation par la valeur S est également utilisée dans la description du présent mémoire conformément à l'usage dans le domaine de la chimie des acides nucléiques. Cependant, comme la "valeur S" est une valeur obtenue par un procédé de mesure de la masse moléculaire des acides nucléiques macromoléculaires sous la forme d'une masse moléculaire comme un tout (ou sous la forme d'un état moléculaire de la substance), la représentation sur la base de la mesure de la longueur de chaîne de la substance (qui est le "nombre de bases" auquel il est fait référence ici) est également mentionnée ici en même temps que cette "valeur S". La raison en est en particulier que la limite d'une répartition des masses moléculaires doit être représentée de manière plus précise dans la mise en application de la présente invention.

Conformément aux moyens classiques de calibrage du poly-I.poly-C et de divers dérivés de celui-ci ayant le poly-I.poly-C comme corps apparenté pour donner des polymères d'acide nucléique à double chaîne calibrés, des polymères d'acide nucléique à double chaîne déjà



7.

existants sont décomposés en composés de faible masse moléculaire ou encore des acides nucléique à un seul brin sont hydrolysés en composés de faible masse moléculaire avant le recuit. Cependant, les moyens classiques ne  
5 conviennent pas pour obtenir le produit désiré à l'échelle industrielle car le calibrage est long à effectuer, et le procédé ne peut pas être effectué rapidement. En outre, les moyens classiques ne sont pas toujours satisfaisants du point de vue du rendement des produits.

10 D'autre part, si on doit sulfurer, après calibrage, des polymères d'acide nucléique à un seul brin, les polymères sont sulfurés avec de l'hydrogène sulfuré et, dans le procédé classique, on fait évaporer l'hydrogène sulfuré du solvant. Il est à noter qu'après sulfuration, on  
15 fait évaporer la pyridine de la solution réactionnelle, par exemple avec une pompe à vide, de telle sorte que l'hydrogène sulfuré peut être éliminé de la solution réactionnelle en même temps que la pyridine par évaporation. Cependant, par ce procédé, l'hydrogène sulfuré s'évapore dans  
20 l'air et par conséquent, ce procédé est désavantageux à l'échelle industrielle du point de vue de la pollution de l'environnement. En outre, conformément à ce procédé, la couche aqueuse séparée après évaporation de la pyridine est placée dans un tube à dialyse pour être dialy-  
25 sée contre de l'eau courante de manière à obtenir le produit désiré. Cependant, le procédé exige au moins 3 jours pour une opération complète, et le rendement du produit est au plus de 80 % environ. Ainsi, ce procédé classique pose divers problèmes techniques en ce qui concerne le  
30 rendement des produits, le coût de fabrication et la durée de l'opération.

On ne peut pas dire non plus que la technique de calibrage elle-même n'a pas été source de difficultés dans la technique antérieure.

35 Dans ce domaine technique, d'une manière générale,

## 8.

on chauffe un polymère d'acide nucléique en présence de formaldéhyde de manière à l'hydrolyser en composés de faible masse moléculaire. Dans ce procédé classique, on obtient des produits ayant la longueur de chaîne désirée en réglant adéquatement la durée de réaction et la température de réaction, puis on soumet la solution réactionnelle à une dialyse de manière à éliminer les composés ayant éventuellement subi une décomposition trop poussée et ayant une taille moléculaire trop faible. Conformément au procédé classique, cependant, des composés ayant diverses répartitions des masses moléculaires se formeraient par calibrage même si les conditions réactionnelles sont maintenues constantes, suivant les propriétés des polymères d'acide nucléique utilisés. Par conséquent, le procédé pose un problème de reproductibilité. On considère que ceci provient du fait que, quand les matières premières destinées à être utilisées dans le procédé sont préparées par une réaction enzymatique, la taille des matières premières ne peut pas être considérée comme constante. En outre, par la dialyse telle qu'elle est appliquée au procédé, il est en principe impossible d'éliminer les polymères d'acide nucléique ayant une longueur de chaîne plus grande que les produits formés. Dans ces conditions, il est souhaitable de disposer d'un moyen fondamental pour résoudre les problèmes de la technique antérieure mentionnés ci-dessus.

En conséquence, la demanderesse a effectué diverses études pour atteindre les objectifs suivants :

- (1) Des polymères d'acide nucléique à deux brins calibrés sont obtenus comme produits par un procédé rapide.
- (2) Le rendement des produits est élevé.
- (3) Même lorsque le procédé est effectué à l'échelle industrielle, le procédé ne cause pas de pollution de l'environnement ni d'autres

perturbations.

(4) Dans ce procédé, les opérations successives sont suffisamment quantitatives et reproductibles.

5 A la suite de ces études, elle a abouti à la présente invention qui fournit :

(1) un procédé de préparation de dérivés d'acide nucléique à deux brins ayant le RNA comme corps apparenté, dont toute la répartition des  
10 tailles moléculaires tombe dans l'intervalle de valeur de la constante de sédimentation de 4S à 13S, dans lequel les polymères d'acide nucléique sont calibrés avant d'être recuits; et

(2) un procédé de préparation de dérivés d'acide  
15 nucléique à double chaîne ayant le RNA comme corps apparenté, dans lequel les molécules pour la répartition maximale dans toute la distribution des tailles moléculaires des dérivés ont des nombres de bases dans l'intervalle de 50 à 10 000, les  
20 polymères d'acide nucléique étant calibrés avant d'être recuits.

En particulier, l'essentiel de la présente invention réside dans les points suivants :

(1) des polymères d'acide nucléique à chaîne  
25 unique sont calibrés avant d'être recuits.

(2) Pour le calibrage dans le stade (1), on utilise la HPLC (filtration sur gel, chromatographie liquide à haute performance) à la place de  
30 l'électrophorèse classique de telle sorte que la répartition des tailles moléculaires des produits est numériquement définie. En conséquence, les fluctuations de la répartition des tailles moléculaires peuvent aisément être contrôlées de telle  
35 sorte que des produits ayant l'intervalle de distribution des tailles moléculaires voulues

10.

correspondant à une valeur de la constante de sédimentation de 4S à 13S (ou à un nombre de bases de 50 à 10 000) peuvent être obtenus rapidement. Le procédé rapide et précis de sélection des produits ayant la longueur de chaîne

désirée a été établi par la présente invention. (3) Après le calibrage, on peut ajouter un alcool inférieur à la solution réactionnelle pour isoler les produits. (Dans les procédés classiques, les produits sont obtenus par dialyse). La présente invention a établi un stade d'isolement extrêmement simple pour augmenter le rendement des produits.

(4) Après le calibrage, si les polymères d'acide nucléique à chaîne unique calibrés doivent être sulfurés, les polymères sont d'abord sulfurés avec de l'hydrogène sulfuré, puis, après addition d'un alcool aryle à la solution réactionnelle de sulfuration, la solution obtenue est soumise à une centrifugation pour éliminer l'hydrogène sulfuré. (Dans les procédés classiques, l'hydrogène sulfuré est directement évaporé du solvant). Ainsi, la présente invention a établi un stade extrêmement simple d'élimination de l'hydrogène sulfuré pour augmenter le rendement des produits.

(5) Comme procédé de réglage et de limitation de la répartition des masses moléculaires des polymères d'acide nucléique à brin unique calibrés, on utilise une résine échangeuse d'ions. (Cette opération est désignée ici sous le nom de "limitation de la taille").

La présente invention sera expliquée à présent plus en détail ci-après.

Le recuit est un stade de liaison complémentaire

## 11.

des polymères d'acide nucléique à un seul brin en polymères à deux brins, et c'est une opération qui peut naturellement être effectuée facilement. Si le calibrage était effectué après le recuit, le degré de sulfuration varierait d'une manière erronée de telle sorte qu'il deviendrait difficile d'obtenir quantitativement le produit. En conséquence, la demanderesse a essayé d'effectuer l'opération de calibrage avant le stade de recuit, et elle a obtenu ainsi un résultat tout à fait excellent. L'aspect (1) mentionné ci-dessus est en relation étroite avec l'aspect (2). Conformément aux moyens classiques de détermination d'une masse moléculaire par électrophorèse, au moins une nuit complète est nécessaire pour la migration, la coloration et d'autres stades, et par conséquent, une opération rapide est difficile. Au contraire, conformément à la présente invention, la filtration sur gel HPLC est appliquée à la détermination de la masse moléculaire des dérivés d'acide nucléique, de telle sorte que le temps de réaction avant l'élution des dérivés ayant la répartition désirée des masses moléculaires (c'est-à-dire entrant dans l'intervalle de valeurs de la constante de sédimentation 4S à 13S ou de nombre de bases de 50 à 10 000) peut être notablement raccourci.

Conformément à la présente invention, on arrête la réaction lorsqu'on constate que la réaction de calibrage est terminée, puis on ajoute un alcool inférieur pour le traitement ultérieur de la solution réactionnelle. Parmi les alcools inférieurs, on préfère particulièrement l'éthanol.

Dans le cas de la précipitation par l'éthanol dans la présente invention, par exemple, le rendement en L-poly-C (poly-C calibré) (le préfixe "L- ..." signifie ci-après "calibré...") à partir du poly-C est de 93 % et le rendement du L-poly-I à partir du poly-I est de 78 %. Par conséquent, le rendement en produits

calibrés est élevé.

Au contraire, dans le procédé classique, on doit placer la solution réactionnelle dans un tube à dialyse pour la dialyse. Dans ce cas, le taux de récupération n'est que de 60 % environ, et on peut s'attendre à ce que le rendement en L-poly-I à partir du poly-I ne soit que d'environ 40 %. En outre, l'opération de dialyse exige une durée de l'ordre de 3 jours.

Cependant, par le procédé de précipitation par l'éthanol de la présente invention, dans lequel de l'éthanol est ajouté à une solution réactionnelle dans une quantité égale à deux fois la solution réactionnelle et agitée de manière à précipiter le produit désiré, puis le précipité obtenu est recueilli par centrifugation et lavé et séché, l'opération peut être terminée en une heure.

L'aspect (3) ci-dessus est la caractéristique la plus importante de la présente invention.

La réaction de remplacement des atomes d'azote dans la partie acide nucléique d'un polymère d'acide nucléique à chaîne unique calibré par des atomes de soufre (par exemple la substitution du groupe amino de la partie radical cytidine dans le poly-C par un groupe mercapto dans une certaine proportion) de manière à transformer cette partie acide nucléique en un acide nucléique différent (la réaction étant désignée ici sous le nom de "sulfuration"), est souvent utilisée dans la synthèse de copolymères. Une autre caractéristique de la présente invention consiste à ajouter un alcool arylique aux polymères d'acide nucléique à chaîne unique calibrés pour l'isolement de copolymères sulfurés. Ceci est l'aspect (4) mentionné ci-dessus.

Comme alcool arylique, on peut par exemple utiliser à cet effet le phénol.

Par exemple, on ajoute d'abord la moitié du phénol à la solution réactionnelle contenant de la pyridine,

## 13.

de l'eau, et de l'hydrogène sulfuré gazeux en mélange, on agite et on centrifuge, de telle sorte que la couche aqueuse se sépare nettement de la couche phénolique, et que l'agent colorant de la solution réactionnelle ainsi  
5 que le soufre formé comme sous-produit etc. passent dans la couche phénolique. On isole, ensuite, la couche aqueuse et on précipite le produit désiré par traitement avec une solution aqueuse de sel et un alcool. Puis, on isole le produit ainsi précipité par centrifugation et le  
10 lave avec un alcool pour obtenir un produit purifié.

Conformément à ce procédé, la quasi-totalité de l'hydrogène sulfuré est transférée dans le liquide surnageant sous la forme d'une solution d'hydrogène sulfuré, et par conséquent celui-ci peut aisément être éliminé du  
15 produit de la réaction.

Par exemple, conformément au procédé de la présente invention utilisant le phénol, l'opération peut être terminée en une heure et le rendement est presque égal à 100 %. En outre, le produit peut être isolé quantitative-  
20 ment.

Les aspects caractéristiques (2) à (4) de la présente invention mentionnés ci-dessus sont importants pour le calibrage avant le recuit. C'est-à-dire que ceux-ci sont tout à fait essentiels pour effectuer efficacement  
25 l'opération de calibrage avant le recuit.

L'aspect (5) mentionné ci-dessus est encore une autre caractéristique de la présente invention, dans laquelle un stade de définition des dimensions est effectué entre les stades de calibrage et de recuit. Ceci sera  
30 expliqué ci-dessous.

Dans ce stade, on utilise une résine échangeuse d'ions. Comme exemple de l'application d'une résine échangeuse d'ions à des acides nucléiques macromoléculaires, de la DEAE-cellulose, du DEAE-Séphadex, de la DEAE-cellulose benzoylée etc. sont appliquées à un t-RNA (BBA, 47,

35

14.

193, 1961; BBRC, 10, 200, 1963; Biochem., 6, 3043, 1967). Dans l'exemple, cependant, la résine échangeuse d'ions n'est appliquée qu'à la purification d'acides nucléiques de faible masse moléculaire ayant un nombre de bases au plus égal à 80 environ.

La demanderesse a effectué diverses études pour savoir si la propriété intrinsèque d'adsorbabilité de charge des résines échangeuse d'ions pouvait être appliquée à la purification de polymères d'acides nucléiques macromoléculaires sur la base de l'indice du nombre de bases des polymères, et elle est parvenue, à la suite de ces études, à la présente invention. Comme les produits finaux à obtenir par la présente invention sont extrêmement utiles comme médicaments, on pense que le fait d'effectuer la définition des dimensions en utilisant une résine échangeuse d'ions (ce qui sera également désigné ici sous le nom de "procédé d'échange d'ions") est une caractéristique particulièrement avantageuse du procédé de l'invention.

Dans le procédé d'échange d'ions de la présente invention, une résine échangeuse d'ions peut être placée dans un récipient contenant un polymère d'acide nucléique à traiter de manière à atteindre l'objectif (procédé discontinu), mais en général, la chromatographie sur colonne est utilisée pour le fractionnement (procédé en colonne). En particulier, une résine échangeuse d'ions est placée dans une colonne et une solution du polymère d'acide nucléique est introduite dans la colonne de façon que le polymère soit adsorbé sur la résine échangeuse d'ions. Puis, on fait passer à travers la colonne un éluant tel qu'un sel-tampon tris ou analogue, linéairement ou par stade, en faisant varier la concentration en sel de manière à obtenir une quantité constante d'éluat. Le nombre de bases du polymère d'acide nucléique contenues dans chaque fraction élue est détecté par la même HPLC



15.

filtration sur gel que ci-dessus en utilisant comme indicateur un marqueur, et on peut ainsi recueillir les fractions contenant le produit final désiré.

5 Pour atteindre l'objectif de la présente invention par le procédé d'échange d'ions mentionné ci-dessus, la nature de la résine échangeuse d'ions à introduire dans la colonne ainsi que la nature de l'éluant à utiliser pour l'élution sont des facteurs extrêmement importants.

10 Par exemple, lorsque du poly-I est dissous dans le tampon tris-HCl et est adsorbé sur du QAE (aminoéthyle quaternaire) utilisé pour la définition des tailles du poly-I, pour l'échange d'ions, le produit désiré ne peut pas être obtenu même si la concentration en sel dans l'éluant est extrêmement élevée. Ceci provient du fait que le poly-I lui-même s'insolubilise lorsque la concentration en sel dans l'éluant est supérieure à celle d'un éluant approprié pour le poly-I sur la résine QAE. Ceci ressort clairement du fait que l'acide inosinique qui est le motif constitutif du poly-I est structurellement plus hydrophobe. Dans ce cas, la concentration en sel dans un éluant approprié pour le poly-I peut être déterminée par comparaison avec le cas du poly-C.

25 Dans une autre expérience effectuée par la demanderesse, il a été observé qu'une solution de poly-I devenait blanche et trouble en formant un précipité dans un tampon ayant une concentration en sel de l'éluant approprié pour le poly-I dans une résine QAE. En conséquence, dans le procédé d'échange d'ions de la présente invention, on peut dire que le choix du type de la résine échangeuse d'ions à utiliser ainsi que le choix de la concentration du sel éluant sont des facteurs extrêmement importants.

35 Par exemple, dans le cas du poly-I, la résine DEAE a donné des résultats extrêmement bons. Dans le cas du poly-C, on a trouvé que tant la résine QAE que la

résine DEAE pouvaient donner des résultats favorables.  
 Pour l'élution, on peut utiliser soit une élution à gradient linéaire, soit une élution à gradient progressif de sel, grâce à quoi les polymères peuvent être fraction-  
 5 nés et élués dans l'ordre de la longueur des chaînes des polymères.

Par exemple, lorsque du poly-C (38 mg,  $S_{20}$ , 8,6) est adsorbé sur du DEAE-Toyoparl 650 C ( $\varnothing$  10 x 130 mm) et est ensuite élué par élution à gradient linéaire en  
 10 utilisant les éluants (A) et (B) suivants, chacun dans une quantité de 100 ml.

(A) = NaCl 0 M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0)

(B) = NaCl 0,5 M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0)

Le gradient linéaire était pour (B) (de 0 % à 100 %);  
 15 et les conditions d'élution étaient les suivantes :

Débit linéaire : 1,32 cm/min.

Vitesse d'élution : 175 gouttes/fraction.

Il en résulte que les fractions suivantes, ayant chacune la longueur de chaîne indiquée, ont été éluées  
 20 dans l'ordre.

|    | <u>Fraction</u> | <u>Paires de bases</u> |
|----|-----------------|------------------------|
|    | 33              | 340                    |
|    | 34              | 470                    |
|    | 35              | 740                    |
| 25 | 36              | 1000                   |
|    | 37              | 1500                   |

En outre, le même échantillon a été élué par élution à gradient progressive, une fraction inférieure à 500 paires de bases était d'abord éluée avec NaCl 0,3M/Tris-  
 30 HCl 10 mM (pH 7,0) (50 ml), puis une fraction de 500 à 1500 paires de bases était éluée avec NaCl 0,5M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0) (50 ml).

De la même manière, on a élué du poly-I (7,8 mg,  $S_{20}$ , 7,3) par élution à gradient linéaire dans les mêmes  
 35 conditions que ci-dessus. Dans ce cas, les fractions

17.

suivantes ont été éluées dans l'ordre.

|   | <u>Fraction</u> | <u>paires de bases</u> |
|---|-----------------|------------------------|
|   | 35              | 30                     |
|   | 36              | 140                    |
| 5 | 37              | 230                    |
|   | 38              | 350                    |
|   | 39              | 460                    |
|   | 40              | 540                    |

En outre, le même échantillon a été élué par élution à gradient par paliers successifs, grâce à quoi une fraction inférieure à 300 paires de bases a d'abord été éluée avec NaCl 0,3M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0) (50 ml) puis une fraction de 300 à 600 paires de bases a été éluée avec NaCl 0,5 M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0) (50 ml).

Comme il a été indiqué ci-dessus, même des acides nucléiques macromoléculaires peuvent être fractionnés par le procédé de la présente invention en fractions d'acide nucléique de longueur de chaîne définie (définition de la taille) en choisissant adéquatement la concentration en sel dans la solution.

Comme il a été illustré dans les deux exemples ci-dessus, des fractions (constituants principaux) ayant une répartition adéquate de longueur de chaîne convenant pour l'utilisation pharmaceutique comme médicaments peuvent aisément être fractionnées à partir d'un mélange contenant divers acides nucléiques macromoléculaires ayant des répartitions différentes de longueur de chaîne, et le fractionnement peut être effectué à l'échelle industrielle. La caractéristique du fractionnement est l'aspect le plus important dans le procédé d'échange d'ions de la présente invention.

Lorsqu'une composition pharmaceutique est fabriquée sous la forme d'une injection, il est bien connu qu'une opération d'élimination des pyrogènes du liquide pour injection est indispensable. Les pyrogènes sont

19.

connus pour être composés de lipopolysaccharides, et ceux-ci ne doivent pas être incorporés à des compositions médicamenteuses. Si les dérivés d'acide nucléique de la présente invention sont utilisés comme injection pour l'administration à l'homme, l'élimination des pyrogènes éventuellement présents est essentielle.

Heureusement, on a trouvé que l'application du procédé d'échange d'inos ci-dessus des dérivés d'acide nucléique de la présente invention peut être efficace pour éliminer les pyrogènes des dérivés.

En conséquence, la demanderesse a poursuivi diverses expériences de manière à étudier plus précisément le phénomène favorable ci-dessus qui a été découvert par hasard, et elle a trouvé en outre que les pyrogènes pouvaient être éliminés de tout acide nucléique à un seul brin quelle que soit sa longueur de chaîne par les procédés d'échange d'ions de la présente invention. Ceci est un autre aspect caractéristique de la présente invention.

En conséquence, la présente invention comprend en outre un mode de réalisation du traitement des dérivés d'acide nucléique de la présente invention par une résine échangeuse d'ions de manière à éliminer les pyrogènes de ceux-ci pour préparer un liquide pour injection contenant le dérivé.

Les résultats obtenus par un test limule de détermination quantitative de la quantité d'endotoxine dans divers RNA à chaîne unique (poly-C du commerce et ses dérivés à chaîne raccourcie) sont donnés dans le tableau.

Dans le tableau, UE (unité d'endotoxine) désigne une unité dans l'essai de fièvre du lapin avec de l'endotoxine étalon USP de référence (E. coli 0113). (1) indique une eau distillée pour injection (témoin); (2) indique un poly-C (produit commercial-1); (3) indique un

19.

poly-C (produit commercial-1); (3) indique un poly-C (produit commercial-2); et (4) indique le produit obtenu dans l'exemple (5-4) suivant.

| 5  | Substance d'essai | Avant ou après la colonne d'échange d'ions | $\mu\text{g/ml}$ | Concentration |        | UE/mg  |
|----|-------------------|--|------------------|---------------|--------|--------|
|    |                   |  |                  | UE/ml         | pg/mg  |        |
|    | (1)               | -  | 29,92            | 0,0868        |        |        |
| 10 | (2)               | Avant                                      | 308,29           | 0,8941        | 548,07 | 1,5895 |
|    |                   | Après                                      | 18,68            | 0,0542        | 33,96  | 0,0985 |
|    | (3)               | Avant                                      | 93,89            | 0,2723        | 166,18 | 0,4891 |
|    |                   | Après                                      | 19,45            | 0,0564        | 34,12  | 0,0989 |
| 15 | (4)               | Avant                                      | 89,63            | 0,2599        | 155,98 | 0,4520 |
|    |                   | Après                                      | 57,45            | 0,1666        | 114,90 | 0,3332 |

L'effet d'élimination des pyrogènes par échange d'ions ressort clairement des résultats du tableau ci-dessus.

L'activité physiologique des dérivés d'acide nucléique de la présente invention est extrêmement utile pour des médicaments. Les dérivés d'acide nucléique de la présente invention ont une forte activité cancérostatique qui sera mentionnée ci-dessous en détail. Cette activité n'est qu'une des diverses autres activités physiologiques des dérivés d'acide nucléique de la présente invention.

Comme autres activités physiologiques des dérivés d'acide nucléique de la présente invention qui ont un poly-I.poly-C comme corps apparenté, on peut en outre mentionner la capacité de production de TNF, la capacité de production d'interféron, la capacité de production d'interleukine 2-, la capacité d'activation des macrophages, la capacité d'activation des cellules NK, l'activité d'inhibition de la prolifération des cellules tumorales, l'activité d'inhibition de la prolifération des cellules tumorales chez la souris rasée portant des

20.

cellules tumorales humaines, l'activité d'inhibition des métastases des cellules tumorales dans le poumon etc.

Les dérivés d'acide nucléique de la présente invention ont une sécurité bien plus élevée que le poly-I.  
5 poly-C classique et les inducteurs de l'interféron analogues. En conséquence, les composés de la présente invention sont utiles comme agent antiviraux, comme agent anti-tumoraux, etc.

Les activités physiologiques des dérivés d'acide  
10 nucléique de la présente invention telles que mentionnées ci-dessus sont décrites en détail dans les descriptions de brevet précitées (demande de brevet japonais n° 62-167433 et une autre demande de brevet sous priorité de cette demande de brevet n° 62-157433).

15 L'exemple suivant est destiné à illustrer la préparation des dérivés d'acide nucléique de la présente invention d'une manière plus détaillée mais non à limiter le domaine de la présente invention.

#### EXEMPLE

20 (1) Préparation et purification du L-poly-I (Poly-I calibré) :

On ajoute 200 ml d'eau distillée, 250 ml de formamide et 500 ml d'une solution de NaCl 5M à 10 g d'un poly-I du commerce et on les chauffe à 80°C pendant environ 4 heures.  
25

On soumet la solution réactionnelle à une filtration sur gel par HPLC en utilisant une colonne G-DNA-PW de gel TSK (7,88 mm de diamètre intérieur x 300 mm) (éluant : tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), solution de  
30 NaCl 0,3 M EDTA 2mM; débit : 0,5 ml/min), après quoi on arrête la réaction lorsqu'on a obtenu une fraction ayant un pic de temps de rétention de  $21,86 \pm 0,2$  minutes.

On ajoute une quantité double d'éthanol à la solution réactionnelle et on recueille le précipité formé par  
35 centrifugation (3000 tours/minute, 4°C). On le lave avec

de l'éthanol à 70 % et on le sèche sous vide, pour obtenir 10,2 g de L-poly-I.

L'eau et les solutions utilisées dans le procédé ci-dessus sont toutes stérilisées. Ceci s'applique également pour ce qui suit.

(2) Préparation et purification du L-poly-C (poly-C calibré) :

On ajoute 200 ml d'eau distillée, 250 ml de formamide et 50 ml d'une solution de NaCl 5M à 10 g de poly-C et on les chauffe à 80°C pendant environ 4 heures. Par la même filtration sur gel par HPLC que ci-dessus, on confirme le point final de la réaction (temps de rétention :  $21,33 \pm 0,2$  min).

On ajoute à la solution réactionnelle une quantité double d'éthanol et on recueille le précipité formé par centrifugation (3000 tours/minute, 4°C). On le lave avec de l'éthanol à 70 % puis on le sèche sous vide pour obtenir 9,5 g de L-poly-C.

(3) Sulfuration du L-poly-C:

On dissout 8,0 g du L-poly-C obtenu dans le stade (2) ci-dessus dans 240 ml d'eau et on les place dans une bombe d'acier de 500 ml. On y ajoute une solution dans la pyridine contenant de l'hydrogène sulfuré (12 g/120 ml) en refroidissant à la glace. Après l'avoir fermée hermétiquement, on chauffe la bombe à 50°C pendant environ 10 heures. Après refroidissement, on ajoute un phénol saturé de TE (200 ml), on l'agite et on le centrifuge (3000 tours/minute, 15°C, 5 minutes). On ajoute 1/10ème de la quantité d'une solution NaCl 5M et une quantité double d'éthanol à la solution aqueuse qui se sépare pour y former un précipité. On recueille le précipité formé par centrifugation (3000 tours/minute, 4°C, 10 minutes), on le lave avec de l'éthanol à 70 % et on le sèche sous vide pour obtenir 8,0 g de L-poly(C<sub>20</sub>, S<sup>4</sup> U) (c'est-à-dire un dérivé de poly-C calibré dans

22.

lequel les acides cytidyliques sont remplacés par de l'acide 4-thiouridylique à raison d'un acide 4-thiouridylique pour 20 acides cytidyliques).

Le TE ci-dessus désigne un tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) contenant de l'EDTA à la concentration de 1 mM.  
(4) Réalisation du recuit :

On dissout 6,00 g du L-poly(C<sub>20</sub>, S<sup>4</sup>U) obtenu dans le stade (3) ci-dessus et 6,44 g du poly-I obtenu dans le stade (1) ci-dessus dans 300 ml d'une solution tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,5)/NaCl 50 mM et on les y mélange. On chauffe la solution obtenue à 70°C dans un bain-marie et on la maintient à cette température pendant 10 minutes. On la laisse ensuite refroidir telle quelle pendant une nuit. Après traitement par le phénol et précipitation par l'éthanol, on ajoute de l'eau (environ 200 ml) au précipité formé de manière à le dissoudre. Puis on dialyse la solution obtenue contre de l'eau à 4°C. On concentre le dialysat à sec pour obtenir 12,4 g d'un composé recuit.

(5) Définition des tailles par un procédé d'échange d'ions

L'échange d'ions a été effectué par élution par paliers successifs ou élution à gradient linéaire. Dans les deux cas, le rendement et la longueur de chaîne des produits ont été presque les mêmes, pourvu que les conditions d'élution soient convenablement choisies. Pour l'élution par paliers successifs du L-poly-C et du L-poly(C, S<sup>4</sup>U), on a utilisé en continu du NaCl 0,15 M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0) et du NaCl 1,0M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0).

En ce qui concerne l'élution par paliers successifs du L-poly-I, on peut se référer à l'exemple (5-1) ci-après.

Pour l'élution à gradient linéaire du L-poly-I, on a utilisé les solutions (A) et (B) suivantes et



23.

l'élution a été effectuée dans les conditions de gradient de la solution (B) de 0 à 100 %.

(A) = NaCl 0 M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0)

(B) = NaCl 0,5 M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0).

- 5 En ce qui concerne l'élution à gradient linéaire du L-poly-C et du L-poly(C, S<sup>4</sup> U), on peut se référer aux exemples (5-2) et (5-4) ci-après.

(5-1) Définition des tailles du L-poly-I :

- On dissout 210 mg du L-poly-I obtenu dans le  
10 stade (1) mentionné ci-dessus dans 5 ml de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,0) et on les adsorbe sur du DEAE-Toyopearl<sup>®</sup> 650 C (Ø 10 mm x 130 mm). Puis on élue par paliers successifs avec un débit linéaire de 1,30 cm/min. avec comme éluants du NaCl 0,03M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0)  
15 (50 ml) et du NaCl 0,5 M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0) (80 ml). On recueille la fraction élue par NaCl 0,5 M et on mesure son temps de rétention par la même filtration sur gel par HPLC que dans le stade (1) ci-dessus, lequel est de 21,90<sup>±</sup> 0,2 (min.).

- 20 Le produit final recherché L-poly-I (dont la taille a été définie) ayant un nombre de base de 100 à 1000 a été obtenu avec un rendement élevé. Le rendement de récupération est de 91 %.

(5-2) Définition des tailles du L-poly-C :

- 25 On dissout 610 mg du L-poly-C obtenu dans le stade (2) ci-dessus dans 10 ml de tampon Tris-HCl (pH 7,0) et on l'adsorbe sur du QAE-Toyopearl<sup>®</sup> 550 C (Ø 10 mm x 130 mm), puis on élue par élution à gradient linéaire avec un débit linéaire de 1,30 cm/min., après quoi on  
30 utilise les solutions (A) et (B) suivantes chacune à raison de 100 ml et on effectue l'élution dans des conditions de gradient de la solution (B) de 0 à 100 %.

(A) = NaCl 0,0M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0)

(B) = NaCl 1,0 M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0)

- 35 La fraction élue comme pic principal est recueillie et

24.

son temps de rétention est mesuré par filtration sur gel par HPLC; il est de  $21,35 \pm 0,2$  min. Le produit final L-poly-C désiré (dont la taille a été définie) ayant un nombre de bases de 100 à 1000 est obtenu avec un rendement élevé. Le taux de récupération est de 93 %.

(5-3) Définition de la taille du L-poly( $C_{12}$ , U) :

19 mg de poly( $C_{12}$ , U) (dans lequel les acides cytidyliques ont été remplacés par l'acide uridylique à raison d'un acide uridylique pour 12 acides cytidyliques) (celui-ci a un temps de rétention de 18,67 minutes dans la même HPLC que dans le stade (1)) ci-dessus sont dissous dans 5 ml de tampon Tris-HCl (pH 7,0) et adsorbés sur du DEAE-Toyopearl<sup>®</sup> 650 C ( $\varnothing$  10 mm x 130 mm). Puis on élué par élution à gradient linéaire avec un débit linéaire de 1,30 cm/min., après quoi les solutions (A) et (B) sont utilisées chacune dans une quantité de 100 ml et l'élution est effectuée dans des conditions de gradient de la solution (B) de 0 à 100 %.

(A) = NaCl 0,0 M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0)

(B) = NaCl 0,5 M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0)

La fraction éluée comme pic principal est recueillie et son temps de rétention est mesuré par filtration sur gel par HPLC qui est de  $18,97 \pm 0,2$  min. Le produit final L-poly-( $C_{12}$ , U) (dont la taille a été définie) recherché ayant un nombre de bases de 100 à 1000 est obtenu avec un rendement élevé. Le taux de récupération est de 87 %.

(5-4) Définition de taille du L-poly( $C_{20}$ ,  $S^4$  U) :

On dissout 600 mg du L-poly( $C_{20}$ ,  $S^4$  U) obtenu dans le stade (3) ci-dessus dans 10 ml de tampon Tris-HCl (pH 7,0) et on les absorbe sur QAE-Toyopearl<sup>®</sup> 550 C ( $\varnothing$  10 mm x 130 mm). Puis on élué par élution à gradient linéaire avec un débit linéaire de..... cm/min, après quoi on utilise les solutions (A) et (B) suivantes chacune dans la quantité de 100 ml et on effectue l'élution

25.

dans des conditions de gradient de la solution (B) de 0 à 100 %.

(A) = NaCl 0,0 M/Tris-HCl 10 mM (pH 7,0)

(B) = NaCl 1,0 M/tris-HCl 10 mM (pH 7,0)

- 5 Le temps de rétention est mesuré par filtration sur gel par HPLC de la même manière que dans le stade (5-2) ci-dessus qui est de  $21,35 \pm 0,2$  min.

Le produit final recherché, le L-poly( $C_{20}$ ,  $S^4$  U) (dont la taille a été définie) ayant un nombre de bases de 100 à 1000 est obtenu avec un rendement élevé. Le taux de récupération est de 90 %.

(6) Recuit :

(6-1) L-poly-I et L-poly-C:

- On dissout séparément 3,0 g du L-poly-C dont la  
15 taille a été définie (obtenu dans le stade (5-2)) ci-dessus et 3,2 g du L-poly-I dont la taille a été définie (obtenu dans le stade (5-1)) ci-dessus dans 150 ml de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,5)/NaCl 50 mM et on les y mélange. On chauffe la solution obtenue à 70°C dans un  
20 bain-marie et on la maintient à cette température pendant 10 minutes. On la laisse ensuite refroidir une nuit telle quelle. Après traitement par le phénol et précipitation par l'éthanol, on ajoute de l'eau (400 ml) au précipité  
25 formé de manière à le dissoudre. Puis on dialyse la solution obtenue contre de l'eau à 4°C. On concentre le dialysat à sec pour obtenir 6,2 g d'un composé recuit.

(6-2) L-poly-I et L-poly-( $C_{20}$ ,  $S^4$  U) :

- On traite 1,46 g du L-poly( $C_{20}$ ,  $S^4$  U) dont la  
30 taille a été définie (obtenu dans le stade (5-4)) ci-dessus et 1,57 g du L-poly-I dont la taille a été définie (obtenu dans le stade (5-1)) ci-dessus de la même manière que dans le stade (6-1) ci-dessus, et l'on obtient dans chaque cas 3,0 g d'un composé recuit.

La présente invention n'est pas limitée aux

35

exemples de réalisation qui viennent d'être décrits,  
elle est au contraire susceptible de modifications et  
de variantes qui apparaîtront à l'homme de l'art.

REVENDECATIONS

1 - Procédé de préparation de dérivés des acides nucléiques à deux brins ayant le RNA comme corps apparenté dont la répartition des tailles moléculaires est  
5 dans l'intervalle de valeur de la constante de sédimentation de 4S à 13S, dans lequel les polymères d'acide nucléique sont calibrés puis recuits.

2 - Procédé de préparation de dérivés des acides nucléiques à deux brins ayant le RNA comme corps apparenté, dans lequel les molécules pour la répartition maxima dans la distribution entière des tailles moléculaires des dérivés ont des nombres de bases dans l'intervalle de  
10 50 à 10 000, dans lequel les polymères d'acide nucléique sont calibrés puis recuits.

3 - Procédé selon les revendications 1 ou 2, dans lequel un alcool inférieur est ajouté à la solution réactionnelle contenant le polymère d'acide nucléique calibré avant le recuit.  
15

4 - Procédé selon la revendication 3, dans lequel  
20 l'alcool inférieur est l'éthanol.

5 - Procédé selon les revendications 1 ou 2, dans lequel les parties d'acide nucléique dans les polymères d'acide nucléique à brin unique calibrés sont sulfurées en présence d'un alcool arylique, avant le recuit.

6 - Procédé selon la revendication 5, dans lequel  
25 l'alcool arylique est un phénol.

7 - Procédé selon les revendications 1 ou 2, dans lequel les polymères d'acide nucléique à brin unique calibrés sont traités par une résine échangeuse d'ions, avant  
30 le recuit, de manière à recueillir les polymères ayant une distribution des tailles moléculaires entrant dans un intervalle déterminé pour la définition de la taille des polymères calibrés.

8 - Procédé de préparation d'un liquide pour  
35 injection essentiellement constitué de dérivés des acides

28.

nucléiques, caractérisé en ce que les pyrogènes présents dans les dérivés, s'il y en a, sont éliminés en utilisant une résine échangeuse d'ions.